

• 实验研究 •

乳腺浸润性微乳头状癌中 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 和 $CD24^{+}$ 表型细胞的研究

李伟东 刘芳芳 徐新生 刘冰冰 崔力方 位嘉 郭晓静 郎荣刚 范宇 谷峰 付丽

【摘要】 目的 研究乳腺浸润性微乳头状癌(invasive micropapillary carcinoma, IMPC)的干细胞表型,从干细胞和上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)角度探讨 IMPC 高侵袭、高转移恶性生物学行为的原因。**方法** 选取术前未经放化疗治疗患者的 IMPC 82 例和乳腺非特殊型浸润性导管癌(invasive ductal carcinoma not otherwise specified, IDC-NOS)80 例石蜡包埋组织标本切片,通过免疫组织化学双染技术检测两组肿瘤组织中 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ ($CD24^{-}$)和 $CD24^{+}$ 的表达、定位和分布情况,并分析其与各临床病理学特征之间的关系。定量资料采用 Student's *t* 检验,定性资料采用 Mann-Whitney U 检验、Kruskal-Wallis 检验、 χ^2 检验或校正 χ^2 检验。两组之间相关性采用 Spearman's 秩相关分析。**结果** (1) IMPC 组肿瘤细胞的 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 阳性表达率(48.8%, 40/82 例),明显高于 IDC-NOS 组(31.3%, 25/80 例)($\chi^2=5.180$, $P=0.023$)。(2) 53.7%(44/82 例)的 IMPC 微细间质组织内见单个散在的 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 肿瘤细胞,且该细胞免疫组织化学染色 Vimentin 及 α -SMA 阳性, E-Cadherin 阴性。IDC-NOS 间质内罕见 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 肿瘤细胞。(3) IMPC 微乳头结构中 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 与间质内的 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 阳性表达细胞呈明显正相关($r=0.516$, $P<0.001$),并且 IMPC 微乳头结构及间质中 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 阳性表达在有无淋巴管侵犯和有无淋巴结外软组织浸润方面的差异均有统计学意义($P<0.050$),即有淋巴管侵犯及淋巴结外软组织浸润者 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 阳性表达率较高。(4) IMPC 组中 $CD24^{+}$ 细胞阳性表达率 79.3%(65/82 例),明显高于 IDC-NOS 组(60.0%, 48/80 例)($\chi^2=7.126$, $P=0.008$),且 IMPC 中淋巴结转移阳性组 $CD24$ 的表达高于阴性组,差异有统计学意义($\chi^2=8.834$, $P=0.003$)。**结论** IMPC 肿瘤细胞中干细胞的存在及上皮间质转化可能是 IMPC 高淋巴管侵犯、高淋巴结转移及耐药等恶性生物学行为的重要原因。研发针对乳腺癌干细胞的药物也可作为治疗乳腺癌的一个方法。

【关键词】 乳腺肿瘤; 乳腺浸润性微乳头状癌; 干细胞; $CD44^{+}/CD24^{-/low}$; $CD24^{+}$; 上皮间质转化

【中图法分类号】 R737.9

【文献标识码】 A

Study on $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ and $CD24^{+}$ tumor cells in invasive micropapillary carcinoma of the breast LI Wei-dong, LIU Fang-fang, XU Xin-sheng, LIU Bing-bing, CUI Li-fang, WEI Jia, GUO Xiao-jing, LANG Rong-gang, FAN Yu, GU Feng, FU Li.
Department of Breast Cancer Pathology and Research Laboratory, Cancer Institution and Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300060, China

作者单位:300060 天津,天津医科大学附属肿瘤医院乳腺病理科 教育部乳腺癌防治重点实验室

基金项目:教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT0743);国家自然科学基金资助项目(30600225);国家“863”计划项目(2006AA02A249);国家“973”计划资助项目(2009CB521700)

通信作者:付丽, E-mail:fulijyb@hotmail.com

【Abstract】 Objective To study the stem cell phenotype of invasive micropapillary carcinoma (IMPC) of the breast. Through the stem cell and epithelial-mesenchymal transition, the causes of biological behaviour of high metastasis and invasion of IMPC was investigated. **Methods** The expression, location and distribution of CD44 and CD24 were determined by immunohistochemical double staining in 82 cases of IMPC and 80 cases of invasive ductal carcinoma not otherwise specified (IDC-NOS), undergoing without preoperative chemotherapy and radiotherapy, and their relationship with clinicopathological features was analyzed. Student's t test was used for quantitative data. Mann-Whitney U test, Kruskal-Wallis test and χ^2 test or revised χ^2 test were used for qualitative data. Spearman's test was used for association between groups. **Results** The positive expression rate of CD44⁺/CD24^{-/low} tumor cells was higher in the IMPC group(48.8%, 40/82 cases) than in the IDC-NOS group (31.3%, 25/80 cases)($\chi^2=5.180, P=0.023$). The CD44⁺/CD24^{-/low} tumor cells was also detected in adjacent stroma surrounding the micropapillary structure in 53.7% (44/82 cases) of IMPC, with Vimentin and α -SMA positive and E-Cadherin negative, but scarce in stroma of IDC-NOS. (3) The CD44⁺/CD24^{-/low} tumor cells in micropapillary structure of IMPC was positively associated with that in stroma ($r=0.516, P<0.001$), moreover, they were both associated with lymphovascular invasion and extranodal extension respectively, and there was statistical difference between lymphovascular invasion and extranodal extension ($P<0.050$), that is the positive expression rate of CD44⁺/CD24^{-/low} in lymphovascular invasion and extranodal extension was high. (4) The positive expression rate of CD24⁺ tumor cells was also higher in IMPC (65/82 cases) than in IDC-NOS (48/80 cases) ($\chi^2=7.126, P=0.008$), and in IMPC the expression of CD24⁺ was higher in positive lymph node metastasis than in negative, with statistical difference ($\chi^2=8.834, P=0.003$). **Conclusions** The existence of stem cells and epithelial-mesenchymal transition in IMPC tumor cells may play an important role in aggressiveness and higher metastatic risk of IMPC of the breast. It can be a method to develop drugs targeting breast cancer stem cells.

【Key words】 Breast neoplasms; IMPC; Stem cells; CD44⁺/CD24^{-/low}; CD24⁺; Epithelial-mesenchymal transition

近年来大量研究表明,肿瘤是由具有不同生物学特征的细胞群体构成,肿瘤组织中存在极少量能够支持肿瘤形成和生长的细胞,称之为肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)^[1]。这些细胞具有自我更新和多向分化能力,在肿瘤的形成和生长过程中起决定性作用,并成为肿瘤转移和复发的根源。乳腺浸润性微乳头状癌(invasive micropapillary carcinoma, IMPC)是一种特殊的乳腺癌亚型,具有高度的淋巴结转移、复发和远处转移能力,预后极差,是研究肿瘤浸润、复发转移的良好模型^[2-6]。本课题组前期研究^[2-4]发现 IMPC 肿瘤细胞不论是在原发灶、脉管内还是转移灶都是以同一种形态的微小乳头或微腺管结构存在,即以“肿瘤细胞的集团性生长侵袭转移”为特征。同时,大量病例资料的回顾性研究结果显示,IMPC 肿瘤患者的耐药现象都提示 IMPC 中可能存在着肿瘤干细胞^[2]。

乳腺癌中表型为 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ ($CD24^{-}$) 的肿瘤细胞具有干细胞的特征^[7-8], 这些细胞不仅具有成瘤和高侵袭特性, 而且对放化疗抵抗^[9-10]。 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 细胞比例越高的患者越易发生远处转移, 尤其是骨转移^[11]。肿瘤细胞的上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是目前肿瘤研究的热点问题, 是指在基底膜上具有排列极性的上皮细胞其极性丢失、突破基底膜向间质细胞转化。对大多数肿瘤而言, 其恶性转化都伴随着上皮表型的缺失并逐渐获得间质表型, 同时肿瘤细胞的迁移和侵袭能力增强^[12]。IMPC 肿瘤细胞呈集团性的细胞团, 与周围间质间没有基底膜结构, 与间质相接的外侧面 E-钙黏附素(E-Cadherin, E-CD)表达缺失^[13], 并表明 IMPC 恶性程度高、容易向间质侵袭和形成转移, 同时也提示 IMPC 这种特殊的生长形式本身可能就是一种 EMT 的初期表现。近期已有研究将 EMT 和乳腺上皮肿瘤干细胞联系起来, 提示乳腺癌细胞可能在 EMT 过程中获得干细胞表型^[14-15]。本研究将具有高淋巴管侵袭、高淋巴结转移的 IMPC 作为研究对象, 以占乳腺癌 80% 以上的非特殊型乳腺浸润导管癌为对照组, 通过免疫组织化学双染技术检测两组中 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 和 $CD24^{+}$ 的表达、定位及分布情况, 并与 IMPC 的临床病理学特征进行分析对比, 从干细胞和 EMT 的角度探讨 IMPC 高侵袭、高转移恶性生物学行为的原因。

1 材料与方法

1.1 组织标本的收集

收集天津医科大学附属肿瘤医院乳腺病理研究室 2005 年 3 月至 2007 年 12 月诊断为 IMPC 患者的肿瘤标本 82 例, 并选取同期诊断为乳腺非特殊型浸润性导管癌(invasive ductal carcinoma, not otherwise specified, IDC-NOS)患者的肿瘤标本 80 例作为实验对照, 同时收集患者相关的临床病例资料。所有病例均由 3 位高年资病理医师复习切片并按照 2003 年 WHO 乳腺和女性生殖系统病理学和遗传学分类标准^[16] 诊断分型, IMPC 病理组织学分级按照 Elston and Elli 分级系统分为 I、II、III 级^[17-18]。所有患者均为女性, 年龄 30~89 岁, 中位年龄 55 岁, 术前均未接受放疗或化疗。

1.2 免疫组织化学染色

以 Polymer 双染检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)进行 $CD44$ (Abcam, ERP1013Y, 1:200)和 $CD24$ (Neomarkers, SN3b, 1:50)免疫组织化学双染色; 为验证双染结果的可靠性, 分别进行单染作为对照。采用 SP 法检测 ER(Zymed, 1:150)、PR(Zymed, 1:150)、HER-2(Neomarkers, 1:800), 以及 EMT 标志物 α -SMA(Zymed, 1:100)、Vimentin(Zymed, 1:100)和 E-CD(Zymed, 1:100)在 IMPC 中的表达。实验步骤按试剂盒说明书进行, 每批实验均设阳性和阴性对照(以 PBS 缓冲液代替一抗), 染色结果用二氨基联

苯胺(DAB)显色。

结果判定:

(1) CD44 染色结果细胞膜呈红色(permanent-red 显色)为阳性,CD24 染色结果以细胞质和(或)胞膜呈棕黄色(DAB 显色)为阳性。双染结果细胞膜呈红色,胞质或胞膜无棕黄色信号干扰的肿瘤细胞判定为 CD44⁺/CD24^{-/low}细胞。由两位高级病理医师采用双盲法阅片,CD44⁺/CD24^{-/low}细胞及 CD24⁺细胞在肿瘤组织中比例均以 $\geq 1\%$ 为阳性^[19]。

(2) ER 和 PR:阳性细胞着色定位于细胞核,切片中阳性细胞 $\geq 15\%$ 为阳性(+) ^[20]。

(3) HER-2:阳性细胞着色定位于细胞膜, $>30\%$ 细胞有不完整胞膜染色为(+), $>30\%$ 细胞有较弱但完整的胞膜染色为(++), $>30\%$ 细胞有较强的完整胞膜染色为(+++) ^[21]。

(4) 采用连续切片免疫组织化学染色检测 IMPC 微乳头结构和间质中 CD44⁺/CD24^{-/low}表型肿瘤细胞 EMT 标志物的表达情况: Vimentin、 α -SMA 的表达均以 $\geq 1\%$ 为阳性^[19]。

1.3 统计学分析

两组年龄及肿瘤大小比较采用 Student's *t* 检验,其他定性资料采用 Mann-Whitney U 检验、Kruskal-Wallis 检验、 χ^2 检验或校正 χ^2 检验。IMPC 间质中和微乳头结构中 CD44⁺/CD24^{-/low}细胞关系采用 Spearman 秩相关分析。所有统计采用 SPSS13.0 统计学软件进行,以 $P < 0.050$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床病理学特征

与 IDC-NOS 对照组相比,IMPC 组的肿瘤最大直径、病理学分期、淋巴结转移率及淋巴结转枚数(IMPC 平均 10.85 枚,IDC-NOS 平均 5.11 枚, $t = 3.750$ $P = 0.000$)均明显高于 IDC-NOS 组($P < 0.001$),且 IMPC 还具有更高的淋巴管侵犯及淋巴结外软组织浸润($P < 0.001$,表 1)。

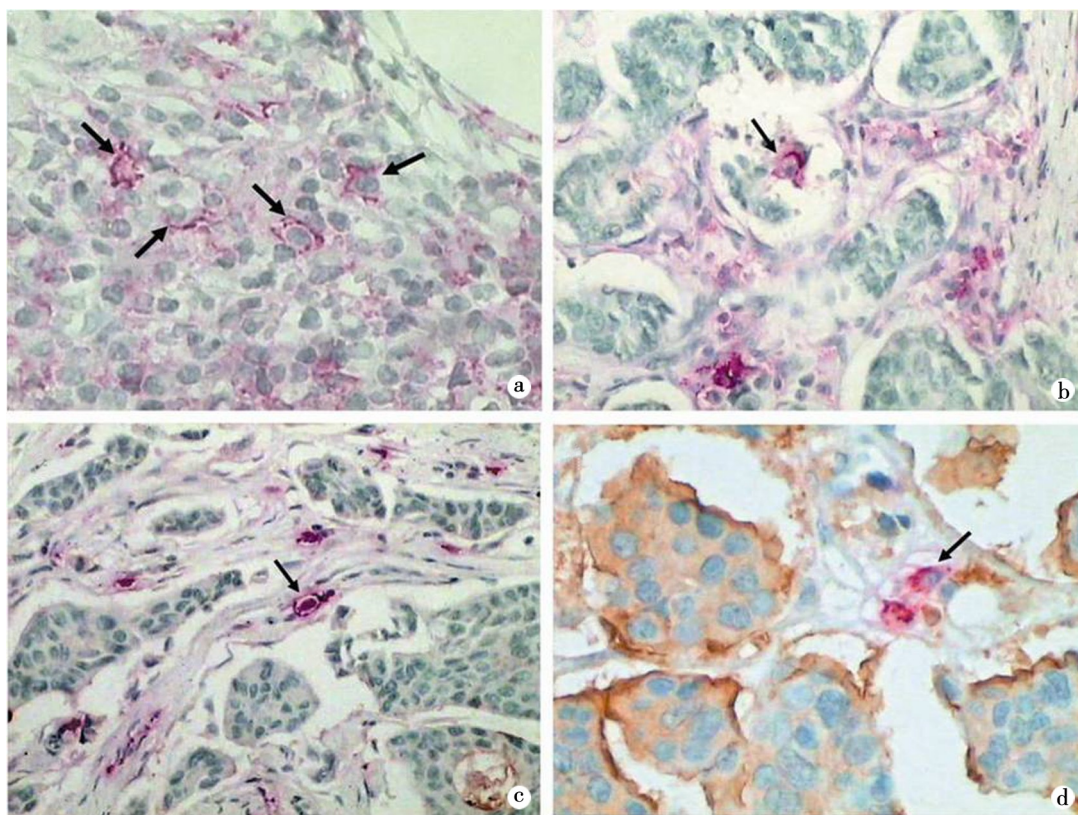
表 1 IMPC 和 IDC-NOS 临床病理学特征的比较

分组	年龄 (岁)	肿瘤大小 (cm)	组织学分级(例)			LNM(例)		pTNM分期(例)			ENE(例)		LVI(例)		CD24 ⁻ (例)		CD24 ⁺ (例)	
			I	II	III	-	+	I	II	III~IV	-	+	-	+	-	+	-	+
IMPC	54.79 \pm 11.17	3.20 \pm 1.46	10	48	24	7	75	4	31	47	30	52	24	58	42	40	17	65
IDC-NOS	51.99 \pm 9.95	2.58 \pm 1.16	7	59	14	37	43	10	52	18	65	15	69	11	55	25	32	48
统计量	1.686	3.000	1.079			29.112		19.958			33.308		53.772		5.180		7.126	
<i>P</i> 值	0.094 ^a	0.003 ^a	0.299 ^b			0.000 ^c		0.000 ^b			0.000 ^c		0.000 ^c		0.023 ^c		0.008 ^c	

IMPC:浸润性微乳头状癌;IDC-NOS:非特殊型浸润性导管癌;LNM:淋巴结转移;ENE:淋巴结外软组织浸润;LVI:淋巴管侵犯;CD24⁻:CD44⁺/CD24^{-/low};a: Student's *t* 检验;b:Kruskal-Wallis 检验;c: χ^2 检验

2.2 CD44⁺/CD24^{-/low}表型细胞的分布和定位

IMPC 中 CD44⁺/CD24^{-/low}表型细胞主要见于假性微乳头结构的肿瘤细胞团内,阳性表达率为 48.8%(40/82 例),IDC-NOS 中 CD44⁺/CD24^{-/low}表型细胞主要见于癌巢内的肿瘤细胞,阳性表达率为 31.3%(25/80 例)(图 1 a、b)。IMPC 组明显高于 IDC-NOS 组,差异具有统计学意义($P<0.050$,表 1)。此外,围绕 IMPC 微乳头结构的间质组织内也可见单个散在的 CD44⁺/CD24^{-/low}肿瘤细胞(图 1 c、d),阳性率为 53.7%(44/82 例),而 IDC-NOS 间质内却罕见 CD44⁺/CD24^{-/low}肿瘤细胞。并且 IMPC 于周围间质中和微乳头结构中的 CD44⁺/CD24^{-/low}细胞之间呈正相关关系($r=0.516$, $P=0.000$,表 2)。连续切片免疫组织化学染色结果显示 IMPC 间质中单个散在的 CD44⁺/CD24^{-/low}表型的肿瘤细胞 Vimentin 及 α -SMA 染色阳性,E-Cadherin 染色阴性,而微乳头结构中的 CD44⁺/CD24^{-/low}表型的肿瘤细胞却呈与之相反的结果,即 Vimentin 及 α -SMA 染色阴性,而 E-Cadherin 染色阳性(图 2)。



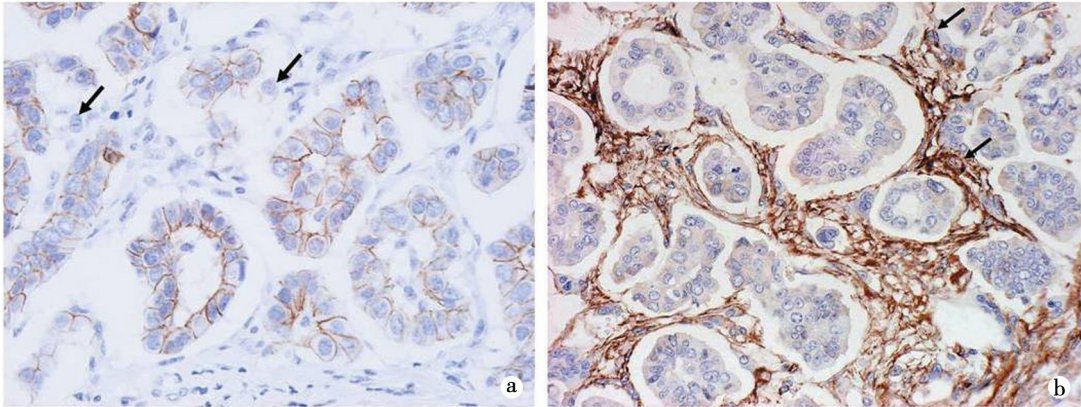
a:箭头所示 IDC-NOS 中 CD44⁺/CD24^{-/low}表型肿瘤细胞,而 CD24 阴性表达($\times 200$);b:箭头所示 IMPC 微乳头结构中的 CD44⁺/CD24^{-/low}表型肿瘤细胞($\times 200$);c:箭头所示 IMPC 微乳头结构周围间质组织中的 CD44⁺/CD24^{-/low}表型肿瘤细胞($\times 200$);d:箭头所示 IMPC 微乳头结构周围间质组织中的 CD44⁺/CD24^{-/low}表型肿瘤细胞,与此相反,相邻的 IMPC 微乳头结构中的肿瘤细胞为 CD24⁺表型($\times 400$);CD44 以 AP-red 显色,红色为阳性表达;CD24 以 DAB 显色,棕色为阳性表达。

图 1 乳腺癌组织中 CD44 和 CD24 的表达

表 2 IMPC 间质和微乳头结构中 CD44⁺/CD24^{-/low}(CD24⁻)细胞的关系

间质中 CD24 ⁻ 细胞	微乳头结构中 CD24 ⁻ 细胞(例)		r 值	P 值
	-	+		
-	30	8	0.516	0.000
+	12	32		

n=82; CD24⁻ 细胞即为 CD44⁺/CD24^{-/low} 细胞



a: E-CD 在 IMPC 微乳头状结构与间质相接的外侧面低表达或表达缺失, 而微乳头中间部分的肿瘤细胞间正常表达或高表达; IMPC 微乳头周围间质组织中少数单个散在的肿瘤细胞可见 E-CD 呈阴性表达(箭头所示)(SP ×200); b: IMPC 微乳头周围间质中单个散在的肿瘤细胞与其周围其他间质细胞相同, 显示 Vimentin 阳性表达(箭头所示), 而微乳头结构中的肿瘤细胞团却与之相反, 显示 Vimentin 阴性表达(SP ×200)。

图 2 免疫组织化学染色显示 IMPC 间质组织中肿瘤细胞 E-CD 和 Vimentin 的表达

2.3 CD44⁺/CD24^{-/low} 表型细胞与临床病理学特征的关系

IMPC 中 CD44⁺/CD24^{-/low} 表达与患者年龄、肿瘤大小、组织学分级、pTNM 分期、淋巴结转移、ER、PR 及 HER-2 等临床病理学特征均无明显关系($P>0.050$, 表 3), 但 IMPC 微乳头结构及间质中的 CD44⁺/CD24^{-/low} 表型细胞在肿瘤细胞的淋巴管侵犯和淋巴结外软组织浸润方面差异有统计学意义($P<0.050$, 表 4)。IDC-NOS 中 CD44⁺/CD24^{-/low} 的表达也与各临床病理学特征无明显关系(数据未列出)。

2.4 CD24 的表达

IMPC 及 IDC-NOS 中 CD24⁺ 细胞均主要见于癌巢内的肿瘤细胞, 间质组织均未见 CD24⁺ 肿瘤细胞。CD24⁺ 在 IMPC 中的阳性表达率(79.3%, 65/82 例)高于 IDC-NOS 组(60.0%, 48/80 例), 差异具有统计学意义($P<0.050$, 表 1, 图 1 a, d 见光盘)。IMPC 中淋巴结转移阳性组 CD24 的表达高于阴性组, 差异有统计学意义($P<0.050$, 表 3), 而与其他临床病理学指标之间无明显关系($P>0.050$, 表 3)。

3 讨论

近年来大量研究证实肿瘤中存在一小群细胞, 不但可以自我更新, 还具有多向分化能力, 正是这些细胞维持并促进了肿瘤的形成和生长^[1,7,20]。Al-Hajj 等^[7]的研究提供了乳腺癌干细胞存在的证据, 他们从肿瘤组织中分离出表

表 3 IMPC 临床病理学特征与 CD44⁺/CD24^{-/low} 和 CD24⁺ 肿瘤细胞的关系

临床病理学特征	CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low}				CD24 ⁺			
	阴性(例)	阳性(例)	统计量	P 值	阴性(例)	阳性(例)	统计量	P 值
年龄								
≤55	18	22			10	30		
>55	24	18	-1.093	0.274 ^a	7	35	-0.925	0.355 ^a
肿瘤大小(cm)								
≤2	9	7			5	11		
2~5	29	31			12	48		
>5	4	2	0.000	1.000 ^b	0	6	2.402	0.121 ^b
组织学分级								
I	7	3			0	10		
II	23	25			10	38		
III	12	12	0.471	0.493 ^b	7	17	2.995	0.083 ^b
淋巴结转移								
-	3	4			5	2		
+	39	36	0.005	0.946 ^c	12	63	8.834	0.003 ^c
pTNM 分期								
I	2	2			2	2		
II	14	17			6	25		
III~IV	26	21	0.656	0.418 ^b	9	38	0.423	0.515 ^b
ER								
-	13	13			3	23		
+	29	27	0.023	0.880 ^d	14	42	1.958	0.162 ^d
PR								
-	13	7			3	17		
+	29	33	2.010	0.156 ^d	14	48	0.529	0.467 ^d
HER-2								
-~+	32	33			14	51		
++~++++	10	7	0.496	0.481 ^d	3	14	0.124	0.725 ^d

n=82; a: Mann-Whitney U 检验; b: Kruskal-Wallis 检验; c: 校正 χ^2 检验; d: χ^2 检验

表 4 IMPC 间质和微乳头结构中 CD44⁺/CD24^{-/low} 细胞与淋巴管侵犯及淋巴结外软组织浸润的关系

病理因素	间质中 CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} 表型肿瘤细胞				微乳头结构中 CD44 ⁺ /CD24 ^{-/low} 表型肿瘤细胞			
	阴性(例)	阳性(例)	χ^2 值	P 值	阴性(例)	阳性(例)	χ^2 值	P 值
淋巴管侵犯								
-	19	5			19	5		
+	19	39	14.703	0.000	23	35	10.607	0.001
淋巴结外软组织浸润								
-	19	11			22	8		
+	19	33	5.493	0.019	20	32	9.259	0.002

n=82

面标志为 CD44⁺/CD24^{-/low} 的细胞,将极少量这样的细胞移植入免疫缺陷小鼠的乳腺中就可以形成肿瘤。这些细胞和组织干细胞一样具有自我更新、无限增殖、多向分化能力和致瘤的特性^[7,8,11,21]。Eleni 等^[22] 的研究显示 CD44⁺/CD24^{-/low} 在乳腺癌中的表达率为 58.7%, Gabriella 等^[19] 报道为

31%,提示 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 表型的肿瘤细胞在乳腺癌中具有异质性。

IMPC 是乳腺浸润性癌中一种特殊的类型。1993 年由 Siriaunkgul 和 Tavassoti^[4]首次提出 IMPC 的概念并描述了 9 例病变,其形态特征由数个肿瘤细胞黏附组成的不含纤维脉管束的微小假乳头或极性倒转的腺管状结构,生物学行为上表现为高淋巴管侵袭性、高淋巴结转移能力、预后极差等特性^[4-5]。2003 年 WHO 将其作为乳腺上皮性肿瘤中浸润性乳腺癌的一种独立病理类型。本研究发现与对照组 IDC-NOS 相比,IMPC 肿瘤体积较大、分期较高、具有较高的淋巴结转移率及转移枚数,以及更高的淋巴管侵犯及淋巴结外软组织浸润,因此笔者推测 IMPC 中可能存在更多具有干细胞特性的肿瘤细胞。本研究发现 IMPC 中 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 表型细胞含量明显高于 IDC-NOS 对照组,此结果支持了上述假设并在一定程度上解释了 IMPC 的恶性生物学行为。曾有文献报道, $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 表型细胞在基底样型乳腺癌中表达较多,尤其常见于与乳腺癌易感基因-1(breast cancer susceptibility gene-1, BRCA-1)相关的遗传性乳腺癌^[19]。这两种乳腺癌也具有相对较差的预后,进而支持了笔者的以上分析。

本研究发现在 53.7% 的 IMPC 病例中, $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 表型细胞也可见于围绕微乳头结构的间质组织中,而 IDC-NOS 间质中罕见 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 表型细胞。通过连续切片免疫组织化学染色发现这些在 IMPC 间质中单个散在的 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 表型细胞同时有间质细胞标志物 Vimentin 及 α -SMA 表达,而失去 E-Cadherin 上皮细胞表型,提示间质中具有 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 表型的细胞可能同时存在 EMT 现象。近期有研究表明 EMT 过程可以介导乳腺癌干细胞表型及其致瘤特性的获得^[15],但 IMPC 微乳头结构中 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 表型细胞却未见此现象。有趣的是,间质中表达 EMT 标志物 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 表型细胞常常伴随着临近微乳头结构中同时出现 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 表型细胞。笔者的前期结果表明,IMPC 中维持上皮表型的一个重要分子 E-CD 在微乳头状的“集团性”肿瘤细胞间正常表达甚至高表达,而与间质相接的外侧面则表达减弱或消失,提示 IMPC 这种特殊的生长形式本身可能就是一种 EMT 的初期表现^[13]。据此笔者推测间质内的 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 表型细胞可能是 IMPC 肿瘤细胞在 EMT 过程中获得了干细胞性表型。Mani 和 Morel 等^[14-15]提出的肿瘤细胞在 EMT 过程中可以获得干细胞性表型的观点支持笔者的分析。

IMPC 中 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 的表达与患者年龄、肿瘤大小、组织学分级、pTNM 分期、淋巴结转移、ER、PR 及 HER-2 等临床病理学特征并无明显关系,但 IMPC 肿瘤细胞集团内及间质中的 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 表型细胞均与其淋巴管侵犯及淋巴结外软组织浸润有明显关系。淋巴管侵犯是淋巴结转移和

远处转移的第一步,上述结果表明此类细胞可能成为肿瘤细胞逃离原发灶并最终形成转移灶的原因。尤其是具有 EMT 特征且散在于间质中的 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 表型细胞可能正是那些能够进入淋巴和血液循环,最终播散至其他组织和器官,并再次增殖形成转移灶的肿瘤细胞。研究表明,对于多数肿瘤而言,肿瘤细胞需要依赖 EMT 过程来脱离肿瘤原发灶;这是肿瘤浸润转移级联过程的第一步^[23]。EMT 过程促进了肿瘤细胞的播散和自我更新,以利于转移灶的形成。本研究未发现 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 表型细胞与淋巴结转移之间的关系,但 CD24 的表达、定位却从一定角度解释了这个结果。同时,也有待于进一步对其与肿瘤耐药、远处转移、复发和生存率的关系进行深入的研究来追溯根由。

CD24 是一种高度糖基化的低分子质量黏附分子,由 27 个氨基酸组成,通过糖基磷脂酰肌醇黏附在细胞膜上;多种恶性肿瘤细胞都可见其表达^[24]。CD24 在正常乳腺组织表达较少,主要表达在萎缩的导管上皮的细胞膜。在浸润性乳腺癌中,CD24 的表达模式主要为胞质、胞膜同时染色。其表达与乳腺癌淋巴结转移相关,并且可以作为乳腺癌的预后指标^[25-26]。本研究结果显示 IMPC 中 CD24 表达率明显高于 IDC-NOS,且 IMPC 中 CD24 的表达与淋巴结转移相关。因此,CD24 可能与 IMPC 高度淋巴管转移的生物学行为有关。目前有研究表明 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ ($CD24^{-}$) 细胞可以在一定诱导剂的作用下,通过 EMT 过程由 $CD24^{+}$ 细胞转化而来^[14-15],因此笔者认为,IMPC 中高表达 CD24 并具有 EMT 潜能的肿瘤细胞可能是 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 表型细胞的来源。

综上所述,IMPC 肿瘤细胞和间质中存在一定数量的 $CD44^{+}/CD24^{-/low}$ 表型细胞,提示 IMPC 肿瘤细胞中不乏干细胞的存在,同时在上皮间质转化过程中少数肿瘤细胞可获得干细胞性表型。这可能是 IMPC 高淋巴管侵犯、高淋巴结转移及耐药等恶性生物学行为的重要原因。

参考文献

- [1] Marx J. Cancer research. Mutant stem cells may seed cancer. *Science*, 2003, 301: 1308-1310.
- [2] Chen L, Fan Y, Lang R G *et al.* Breast carcinoma with micropapillary features: clinicopathologic study and long-term follow-up of 100 case. *Int J Surg Pathol*, 2008, 16: 155-163.
- [3] Guo X J, Chen L, Lang R G, *et al.* Invasive micro-papillary carcinoma of the breast: association of pathologic features with lymph node metastasis. *Am J Clin Pathol*, 2006, 126: 740-746.
- [4] Sinaunkgul S, Tavassoli F A. Invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Mod Pathol*, 1993, 6: 660-662.
- [5] Middleton L P, Tressera F, Sobel M E, *et al.* Infiltrating micropapillary carcinoma of the breast. *Mod Pathol*, 1999, 12: 499-504.
- [6] Tsumagari K, Sakamoto G, Akiyama F, *et al.* The pathological diagnosis and clinical significance

- of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Jpn J Breast Cancer*, 2001, 16: 441—447.
- [7] Al Hajj M, Wicha M S, Benito H A, *et al.* Prospective Identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 3983—3988.
- [8] Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, *et al.* Isolation and *in vitro* propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res*, 2005, 65: 5506—5511.
- [9] Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs R K, *et al.* CD44⁺/CD24⁻ breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*, 2006, 8: R59.
- [10] Phillips T M, McBride W H, Pajonk F. The response of CD44⁺/CD24^{-/low} breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98: 1777—1785.
- [11] Abraham B K, Fritz P, McClellan M, *et al.* Prevalence of CD44⁺/CD24^{-/low} cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clinical Cancer Res*, 2005, 11: 1154—1159.
- [12] Christiansen J J, Rajasekaran A K. Reassessing epithelial-mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*, 2006, 66: 8319—8326.
- [13] Fan Y, Lang R G, Wang Y, *et al.* Relationship between expression of cell adhesion molecules and metastatic potential in invasive micropapillary carcinoma of breast. *Chin J Pathol*, 2004, 33: 308—311.
- [14] Mani S A, Guo W, Liao M J, *et al.* The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cell. *Cell*, 2008, 133: 704—715.
- [15] Morel A P, Lièvre M, Thomas C, *et al.* Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. [http:// www. plosone. org /article/info: doi/10. 1371/ journal. pone. 0002888](http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0002888).
- [16] Tavassoli F A, Devilee P. Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs. World Health Organization Classification of Tumors. Lyon: IARC Press, 2003: 35—36.
- [17] Elston C W, Ellis I O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 1991, 19: 403—410.
- [18] Wei J, Cui L F, Liu F F, *et al.* E-selectin and sialyl lewis X expression is associated with lymph node metastasis of invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Inter J Surg Pathol*, 2008, 8: 1—8.
- [19] Gabriella H, Par Ola B, Markus R, *et al.* The CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res*, 2008, 10: R53.
- [20] Ailles L E, Weissman I L. Cancer stem cells in solid tumors. *Curr Opin Biotechnol*, 2007, 18: 460—466.
- [21] Carol S, Hiromitsu K, Robyn K F, *et al.* CD44⁺/CD24⁻ breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*, 2006, 8: R59.
- [22] Eleni M, Ioanna G, Emmanouil F, *et al.* The clinico-pathologic and prognostic significance of CD44⁺/CD24^{-/low} and CD44⁻/CD24⁺ tumor cells in invasive breast carcinomas. *Human Pathol*, 2008, 39: 1096—1102.
- [23] Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, 15: 740—746.
- [24] Kay R, Rosten P M, Humphries R K. CD24, a signal transducer modulating B cell activation

responses, is a very short peptide with a glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor. J Immunol, 1991, 147: 1412—1416.

- [25] Baumann P, Cremers N, Krocese F, *et al.* CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. Cancer Res, 2005, 65: 10 783—10 793.
- [26] Kristiansen G, Winzer K J, Mayordomo E, *et al.* CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. Clinical Cancer Res, 2003, 9: 4906—4913.

(收稿日期: 2009-06-19)

(本文编辑: 罗承丽)

李伟东, 刘芳芳, 徐新生, 等. 乳腺浸润性微乳头状癌中 CD44⁺/CD24^{-/low} 和 CD24⁺ 表型细胞的研究[J/CD]. 中华乳腺病杂志: 电子版, 2009, 3(5): 524—534.